

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

①1 N° de publication :

2 795 426

(à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

99 07948

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 Q 1/68, B 01 L 3/00, G 01 N 33/53, 33/543

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 22.06.99.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
 demande : 29.12.00 Bulletin 00/52.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
 recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
 présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
 apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
 MIQUE Etablissement de caractère scientifique techni-
 que et industriel — FR.

⑦2 Inventeur(s) : CAILLAT PATRICE, FOUILLET YVES,
 VAUCHIER CLAUDE et CLERC JEAN FREDERIC.

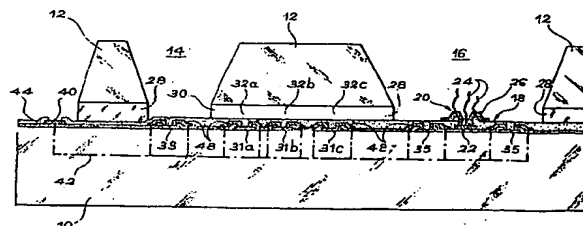
⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : BREVATOME.

⑤4 SUPPORT D'ANALYSE BIOLOGIQUE A AMPLIFICATION.

⑤7 L'invention concerne un support d'analyse biologique
 comprenant au moins une plage de test (18) équipée d'une
 pluralité de sites d'analyse (20) susceptibles d'être garnis
 de sondes biologiques, au moins un réservoir (14) destiné à
 contenir un milieu à analyser et au moins un passage (30)
 de fluide dudit réservoir vers ladite plage de test, dans le-
 quel le passage de fluide comporte des moyens (31) de
 contrôle de température agencés le long du passage de fluide.

Application à l'analyse biologique d'acides nucléiques.



FR 2 795 426 - A1



SUPPORT D'ANALYSE BIOLOGIQUE A AMPLIFICATION

Domaine technique

La présente invention concerne un support
5 d'analyse biologique, encore appelé biopuce, et destiné
en particulier à l'analyse génétique.

Les biopuces comportent généralement des plages
de test équipées d'une pluralité de sites d'analyse.
Sur ces sites sont greffés ou fixés tout ou partie
10 d'acides nucléiques tels que, par exemple, des morceaux
de brins d'ADN ou d'ADNC. Chaque site peut être équipé
de brins, encore appelés sondes, dont le code ou la
séquence génétique est connue.

Pour l'analyse, la puce est mise en contact
15 avec un milieu à analyser contenant également des
acides nucléiques.

Les acides nucléiques du milieu à analyser,
appelés cibles, ont alors la faculté de s'hybrider
sélectivement avec des sondes de la biopuce.
20 L'hybridation a lieu exclusivement entre des cibles et
des sondes présentant un code génétique complémentaire.

Ainsi, il est possible, en détectant les sites
d'analyse sur lesquels une hybridation a eu lieu, de
déterminer la matière biologique initialement présente
25 dans le milieu à analyser.

Les biopuces trouvent des applications dans
l'analyse biologique et génétique, notamment dans les
domaines médicaux.

30

Etat de la technique antérieure

Comme évoqué sommairement ci-dessus, l'analyse
biologique avec les biopuces comporte trois étapes

principales qui sont la préparation des sites d'analyse pour y fixer les sondes, la mise en contact de la biopuce avec le milieu à analyser, puis la lecture de la biopuce pour déterminer quels sites ont fait l'objet
5 d'une hybridation entre sondes et cibles.

On connaît différentes techniques permettant de fixer des sondes nucléiques sur les sites d'analyse des biopuces. Parmi ces techniques, on peut citer celles, par exemple, qui font appel à un composé intermédiaire
10 tel que des silanes, de la poly-L-lysine ou encore un polymère conducteur, copolymérisé sur chaque site avec les sondes. Dans ce dernier cas, la fixation des sondes est initiée et pilotée par l'application sélective sur les sites d'une tension de polarisation. Les sites sont
15 alors formés par un plot en un matériau conducteur électrique.

Ces techniques, connues en soi, sont illustrées par exemple par les documents (1), (2) et (3) dont les références sont précisées à la fin de la description.

20 La lecture des puces, c'est-à-dire l'examen des différents sites d'analyse pour détecter si des hybridations ont eu lieu ou non, peut être effectuée par microscopie. De façon avantageuse cependant, l'hybridation peut aussi être mise en évidence par la
25 détection d'une lumière de fluorescence émise par les cibles fixées sur les sondes, en réponse à une lumière d'excitation. Cette deuxième possibilité nécessite toutefois une préparation du milieu à analyser pour fixer sur les cibles des marqueurs fluorescents. A ce
30 sujet, on peut se reporter également au document (1) déjà mentionné.

Le milieu à analyser, obtenu par extraction de l'ADN ou d'ADNC d'un échantillon à tester, peut subir

d'autres traitements préalables à sa mise en contact avec la biopuce. Parmi ces traitements, on peut citer un traitement de multiplication des cibles.

En effet, le nombre d'ADN ou d'ADNC cibles
5 présents dans un échantillon à tester est généralement faible. Il peut être augmenté par un procédé de multiplication basé sur la duplication enzymatique des brins d'ADN ou d'ADNC. Ce procédé peut être une "amplification" du type PCR (Polymerase Chain Reaction-
10 duplication polymerase).

L'amplification de l'ADN ou de l'ADNC est réalisée en ajoutant au milieu des enzymes et des précurseurs appropriés et en faisant subir au milieu des cycles thermiques à des températures déterminées.
15 Les cycles d'amplification peuvent être effectués sur des supports miniaturisés, tels que des puces, et peuvent être associés à un tri par électrophorèse.

Une illustration de ces techniques est donnée, par exemple, par les documents (4), (5) et (6) dont les
20 références sont également précisées à la fin de la description.

L'ensemble des opérations liées aux analyses biologiques, et décrites sommairement ci-dessus, contribuent à augmenter la difficulté de mise en oeuvre
25 de ces analyses, et donc leur coût.

En particulier, l'opération d'amplification des brins d'ADN s'avère délicate et suppose un nombre élevé de manipulations.

30 Exposé de l'invention

L'invention a pour but de proposer un support d'analyse qui intègre différents moyens susceptibles

d'être mis en oeuvre pour réaliser les différentes étapes de préparation, d'analyse et de lecture.

Un but est en particulier de rationaliser et de simplifier les opérations de préparation, afin de
5 réduire le coût de l'analyse et garantir une fiabilité élevée.

Un autre but de l'invention est de proposer des procédés de fabrication du support d'analyse.

De façon plus précise, l'invention a pour objet
10 un support d'analyse biologique comprenant au moins une plage de test qui est équipée d'une pluralité de sites d'analyse susceptibles d'être garnis de sondes biologiques, au moins un réservoir destiné à contenir un milieu à analyser, et au moins un passage de fluide
15 dudit réservoir vers ladite plage de test, dans lequel des moyens de contrôle de température sont agencés le long du passage de fluide.

Les moyens de contrôle de la température sont prévus pour fixer des températures de consigne en
20 différentes zones successives le long du passage, de façon à pouvoir initier une multiplication, par exemple de type PCR, de brins d'ADN ou d'ADNC susceptibles d'être présents dans le milieu à analyser.

Lorsqu'une pluralité de zones contrôlées en
25 température sont prévues, on peut effectuer un ou de préférence plusieurs cycles thermiques de multiplication successifs.

Le milieu à analyser introduit dans le réservoir peut ainsi être un milieu n'ayant pas subi de
30 traitement de multiplication préalable, c'est-à-dire un milieu relativement pauvre en cibles à détecter.

En circulant à travers le (ou les) passage(s) entre le réservoir et la plage de test, les brins d'ADN

ou d'ADNC du milieu sont multipliés de façon à pouvoir être détectés plus facilement sur les sites d'analyse.

La multiplication des brins d'ADN est opérée au moyen d'enzymes ajoutés au milieu. Ces enzymes peuvent
5 être mélangés directement au milieu introduit dans le réservoir du support, mais peuvent également être également stockées dans des réservoirs additionnels du support.

Dans ce cas, des conduites intérieures au
10 support d'analyse, peuvent être prévues pour effectuer le mélange entre le milieu à analyser et les enzymes.

Selon un aspect particulier de l'invention, le passage de fluide peut comprendre une pluralité de canaux juxtaposés, s'étendant de façon sensiblement
15 parallèle entre le réservoir et la plage de test. Les canaux peuvent être également repliés de façon à décrire des méandres entre le réservoir et la plage de test.

La mise en oeuvre d'une pluralité de canaux
20 permet de traiter une plus grande quantité de fluide tout en garantissant pour chaque canal une faible inertie thermique. Une faible inertie thermique du milieu à analyser permet de faire passer rapidement sa température d'une valeur de consigne donnée à une
25 valeur de consigne suivante d'un cycle thermique. Cette caractéristique favorise l'opération de multiplication.

Selon un autre aspect particulier de l'invention, les moyens de contrôle de la température peuvent comporter une pluralité d'éléments de
30 chauffage, tels que des résistances électriques, par exemple. Celles-ci définissent des zones de chauffage qui se succèdent entre le réservoir et la plage de test.

Les éléments de chauffage peuvent être disposés directement dans le passage de fluide ou en être séparé par une paroi.

Il convient de noter que d'autres moyens de
5 contrôle de la température, par chauffage ou par refroidissement, peuvent également être prévus. Parmi ceux-ci on peut citer, par exemple, des canaux parcourus par des fluides caloporteurs thermostatés ou des éléments Peltier. L'utilisation de résistances
10 électriques permet toutefois un adressage et un contrôle électrique amélioré. De plus, l'encombrement des résistances électriques sur le support est particulièrement réduit.

Les sites d'analyse de la puce peuvent être
15 garnis avec les molécules formant les sondes, selon différentes techniques choisies, par exemple, parmi celles mentionnées dans la description de l'art antérieur.

Lorsque le dépôt de sondes par voie
20 électrochimique est retenu, les sites comportent des électrodes conductrices. L'adressage sélectif des sites par des moyens électriques permet alors d'appliquer successivement ou simultanément à chaque site un potentiel susceptible d'initier la fixation des sondes.

25 Les électrodes, ou certaines d'entre elles, peuvent être associées à des contre-électrodes ménagées à leur voisinage. Ainsi, il est possible de fixer les sondes par voie électrolytique en faisant circuler un courant approprié respectivement entre chaque électrode
30 et la contre-électrode qui y est associée.

Une ou plusieurs contre-électrodes peuvent également être séparées de la structure du support d'analyse.

L'adressage électrique des électrodes peut être un adressage direct en associant à chaque électrode, ou contre-électrode, une borne d'adressage. L'adressage peut aussi être du type multiplexé à partir d'un nombre
5 réduit de bornes d'adressage.

Selon encore une autre réalisation particulière du support d'analyse, les sites d'analyse peuvent être associés individuellement ou collectivement à des moyens électriques de chauffage. Les moyens de
10 chauffage permettent de porter chaque site, ou un ensemble de sites, à une température optimale pour l'hybridation de cibles avec les sondes particulières qui équipent ces sites.

L'adressage électrique des moyens de chauffage, c'est-à-dire leur commande d'alimentation, peut
15 également être multiplexé ou non.

L'invention concerne également un procédé de fabrication d'un support d'analyse tel que décrit précédemment.

20 Le procédé comprend les étapes suivantes :

- la formation de résistances de chauffage sur une première face d'un substrat principal dans une région dite de multiplication, et la formation de sites d'analyse sur la première face, en dehors de
25 la région de multiplication,
- la formation d'au moins un orifice d'entrée sur un côté de la région de multiplication éloigné des sites d'analyse, et la formation d'au moins un orifice de sortie sur un côté de la région de
30 multiplication tourné vers les sites d'analyse, les orifices s'étendant partiellement dans le substrat principal depuis la première face,

- la formation d'au moins une rainure dans le substrat principal depuis une deuxième face, opposée à la première face, la rainure s'étendant dans la région de multiplication et reliant au moins un orifice d'entrée à au moins un orifice de sortie,
- après la formation de la rainure, le report du substrat principal sur un substrat de support par la deuxième face, de façon à recouvrir chaque rainure, et former ainsi au moins un canal,
- la mise en place d'un capot ajouré s'appuyant sur la première face du substrat principal, le capot délimitant au moins un réservoir qui entoure au moins un orifice d'entrée, et délimitant une plage de test qui comprend les sites d'analyse et au moins un orifice de sortie.

La formation des sites d'analyse peut comporter la réalisation de plots, de plages ou d'électrodes d'accrochage, prévus pour recevoir des sondes.

Il convient de préciser également que les étapes énumérées ci-dessus ne doivent pas nécessairement être exécutées dans l'ordre dans lequel elles sont présentées.

Selon une autre possibilité de mise en oeuvre de l'invention, le substrat d'analyse peut également être fabriqué selon un procédé, dans lequel :

- on grave dans un substrat de support, au moins une rainure,
- on reporte sur le substrat de support, un substrat principal de façon à fermer la rainure,
- on forme sur le substrat principal des résistances électriques dans une région dite de multiplication coïncidant avec ladite rainure,

- on forme des sites d'analyse dans une région hors de la région de multiplication, au voisinage d'une extrémité de la rainure,
- 5 - on pratique au moins un orifice d'entrée dans le substrat principal, traversant ledit substrat principal et communiquant avec une extrémité d'au moins une rainure, tournée à l'opposé des sites d'analyse,
- 10 - on pratique au moins un orifice de sortie dans le substrat principal et communiquant avec l'extrémité d'au moins une rainure, tournée vers les sites d'analyse,
- 15 - on met en place un capot ajouré s'appuyant sur le substrat principal, le capot délimitant au moins un réservoir qui entoure au moins un orifice d'entrée, et délimitant au moins une plage de test qui comprend des sites d'analyse et au moins un orifice de sortie.

20 Comme pour le procédé exposé précédemment, l'ordre des étapes n'est pas impératif.

Par ailleurs, une étape d'amincissement du support principal peut être prévue après son report sur le substrat de support. Cette étape permet de ne conserver qu'une épaisseur plus faible de matière, 25 suffisante pour supporter les résistances électriques, mais qui présente une faible inertie thermique.

Enfin, selon une troisième possibilité de mise en oeuvre du procédé de fabrication du support d'analyse, celui-ci peut comporter les étapes 30 suivantes :

- la formation de résistances électriques sur une face d'un substrat dans une région dite de multiplication,

- la formation de sites d'analyse en dehors de la région de multiplication,
- la mise en place d'au moins un capot ajouré sur le substrat, le capot délimitant au moins un réservoir en dehors de la région de multiplication, et délimitant une plage de test comprenant les sites d'analyse, le capot étant traversé dans la région de multiplication d'au moins un passage reliant le réservoir à la plage de test.

De même que pour les procédés indiqués précédemment, l'ordre des étapes indiquée correspond à un ordre préférentiel mais non impératif.

Le passage dans la portion de paroi qui sépare la plage de test du réservoir peut être formé en pratiquant une pluralité de rainures dans une partie du capot destinée à recouvrir le substrat entre le réservoir et la plage de test et en reportant le capot sur le substrat de façon à recouvrir les rainures et former ainsi des canaux.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront mieux de la description qui va suivre, en référence aux figures des dessins annexés. Cette description est donnée à titre purement illustratif et non limitatif.

Brève description des figures

- La figure 1 est une coupe schématique simplifiée d'un support d'analyse conforme à l'invention,

- la figure 2 est une représentation schématique correspondant à une vue de dessus d'un support d'analyse conforme à l'invention,

- les figures 3A à 3D sont des coupes schématiques d'un substrat d'analyse lors de différentes étapes de sa fabrication, selon un premier procédé conforme à l'invention,

5 - la figure 4 est une coupe schématique d'un substrat d'analyse conforme à l'invention, constituant une variante par rapport au support de la figure 3D,

 - les figures 5A à 5F sont des coupes schématiques d'un substrat d'analyse lors de
10 différentes étapes de sa fabrication, selon un deuxième procédé conforme à l'invention.

Description détaillée de modes de mise en oeuvre de l'invention

15 Le support d'analyse de la figure 1 comporte un substrat de support 10 sur lequel est collé un capot 12. Le substrat de support et le capot sont par exemple en silicium.

 Le capot définit au-dessus du substrat de
20 support un réservoir d'entrée 14 destiné à contenir un milieu à analyser et un réservoir de sortie 16 qui entoure une plage de test 18 du substrat 10.

 L'ouverture du réservoir d'entrée 14 est
ajustée pour recevoir, par exemple, une tête
25 d'alimentation d'un système de type pousse-seringue.

 La plage de test 18 est équipée d'une pluralité de sites d'analyse dont un seul est représenté avec la référence 20. Dans l'exemple illustré, le site d'analyse 20 comporte une électrode métallique 22, par
30 exemple en or, garnie de sondes nucléiques 24.

 Les sondes nucléiques sont par exemple des brins d'ADN fixés sur l'électrode par l'intermédiaire d'un polymère conducteur 26.

Il convient de préciser que, pour des raisons de clarté des figures, les différents éléments représentés ne le sont pas selon une échelle homogène.

Le réservoir d'entrée 14 et le réservoir de sortie 16 communiquent par un réseau de canaux 30. Ceux-ci permettent la circulation du milieu à analyser depuis le réservoir d'entrée 14 où il est introduit, vers la plage de test 18 équipée des sites d'analyse.

Dans l'exemple illustré, les canaux 30 sont gravés, par exemple, dans une couche 28 en polyimide, d'une épaisseur de 5 à 30µm, située à la base du capot, en contact avec le substrat. Les dimensions en section des canaux sont comprises, par exemple, entre 5 et 100µm, pour une longueur de canal de l'ordre de 5 mm. Les parois de séparation entre les canaux ont une épaisseur de l'ordre de 5 à 20µm.

Les canaux 30 correspondent à une zone du support d'analyse dédiée à l'amplification, c'est-à-dire la multiplication des cibles nucléiques initialement présentes dans le milieu à analyser. A cet effet, les canaux sont équipés d'une pluralité d'éléments de contrôle de la température 31a, 31b, 31c, agencés de façon à définir une pluralité de zones 32a, 32b, 32c à température contrôlée. Ces zones se succèdent entre l'entrée des canaux, correspondant au fond du réservoir d'entrée 14, jusqu'à la plage de test 18.

Les zones 32a, 32b, 32c des canaux sont portées à des températures différentes, généralement comprises dans une gamme allant de 40°C à 95°C, de façon à faire subir au liquide qui traverse les canaux un ou plusieurs cycles thermiques adaptés à une multiplication de type PCR.

Dans l'exemple de la figure, seules trois zones 32a, 32b, 32c sont indiquées. Celles-ci permettent de réaliser un seul cycle thermique. Toutefois, un nombre plus grand de zones, par exemple 90 zones, peut être
5 prévu pour réaliser de l'ordre de 30 cycles thermiques.

Le nombre de cycles et la température des zones peuvent être fixés par les éléments de contrôle de la température 31a, 31b, 31c. Les températures sont déterminées en fonction du type d'enzymes ajoutées au
10 milieu pour l'amplification et/ou en fonction des acides nucléiques à multiplier.

Selon une variante, il est possible également de prévoir un certain nombre de zones de chauffage, par exemple trois, et de donner aux canaux une forme
15 repliée en méandres ou en serpentins de façon à parcourir plusieurs fois les zones de chauffage.

Dans l'exemple décrit, les éléments de contrôle de la température sont équipés de résistances électriques chauffantes, par exemple en silicium polycristallin, connectées par des pistes conductrices
20 à des bornes électriques 40 prévues sur un bord du substrat.

Les connexions entre des résistances électriques et les bornes électriques 40 peuvent être
25 des connexions directes par pistes conductrices 48, et/ou des connexions effectuées par l'intermédiaire d'un circuit multiplexeur, représenté de façon schématique avec la référence 42.

Des moyens de connexion non représentés peuvent
30 également être prévus pour relier les électrodes 22 des sites d'analyse à des bornes d'adressage ménagées sur le bord du substrat.

Dans le réservoir d'entrée on trouve une résistance électrique 33 destinée à préchauffer le milieu à analyser avant son passage dans les canaux 30.

De la même façon, des résistances électriques
5 35 sont prévues sous la plage de test 18 au voisinage des sites d'analyse 20. Ces résistances électriques 35 permettent de contrôler la température au voisinage des sites pour maintenir celle-ci à une valeur favorisant l'hybridation entre les cibles et les sondes.

10 Les résistances électriques dans le réservoir d'entrée et dans le réservoir de sortie, sont, comme celles des canaux, reliées de façon sélective à des bornes électriques 40 sur le bord du substrat 10, par l'intermédiaire du circuit 42.

15 Enfin, une couche isolante électrique 44, par exemple en nitrure recouvre les résistances. Elle entoure également les bornes électriques 40 et les électrodes 22 des sites d'analyse.

20 La figure 2 est une vue de dessus d'un substrat d'analyse conforme à l'invention.

On observe que le réservoir d'entrée 14 communique avec une pluralité d'orifices d'entrée 34 d'une pluralité de canaux 30, adjacents et parallèles
25 entre eux. Les canaux, représentés en trait discontinu, s'étendent de façon rectiligne sous le capot 12 pour se terminer respectivement par des orifices de sortie 36. Les orifices de sortie sont prévus pour déverser le milieu à analyser dans le réservoir de sortie 16.

30 Les orifices de sortie 36 sont ménagés sur la plage de test 18 au voisinage de sites d'analyse.

Les sites d'analyse, qui sur cette figure sont dépourvus de garniture, sont formés chacun par une

électrode 22, sous la forme d'un plot métallique conducteur, et par une contre-électrode métallique 23 qui entoure respectivement l'électrode 22 à laquelle elle est associée.

5 L'utilisation de sites d'analyse comportant respectivement une électrode et une contre-électrode permet de former sur les sites une garniture de molécules-cibles par voie électrolytique. Un adressage électrique sélectif des électrodes permet en outre de
10 choisir les électrodes devant être garnies et fixer ainsi plus aisément des sondes différentes en différents sites.

Pour l'adressage des électrodes, le support comporte une pluralité de bornes électriques 40a de
15 contact ménagées sur le bord du substrat. Celles-ci sont reliées par des pistes conductrices 48a, respectivement à la pluralité d'électrodes 22. De la même façon, des bornes 40b sont reliées par des pistes 48b aux contre-électrodes 23.

20 Enfin un ensemble de bornes d'adressage 40c sont prévues pour appliquer un courant électrique aux éléments de contrôle de la température, en l'occurrence les résistances électriques décrites en référence à la première figure.

25 Pour des raisons de clarté, ces résistances électriques et les lignes de connexion prévues pour leur alimentation depuis les bornes 40c ne sont pas représentées.

30 Le support d'analyse comporte, par exemple, 48 bornes électriques 40a, 40b, 40c sous la forme de plots métalliques d'une longueur de 4 mm, une largeur de 200µm et espacés de 100µm.

Ces bornes sont prévues pour connecter le support d'analyse à des générateurs de tension et de courant extérieurs.

Lorsque le nombre de sites d'analyse est très important ou lorsqu'un grand nombre d'éléments de contrôle de la température doivent être alimentés, un adressage électrique par multiplexeur peut être envisagé.

La garniture des sites peut également avoir lieu par électro-polymérisation.

Dans ce cas, un mélange comprenant par exemple un premier pyrrole et un deuxième pyrrole porteur de molécules sondes est déposé par pipetage sur des sites définis par une ou plusieurs électrodes.

Une tension de polarisation appliquée entre la ou les électrodes et une ou plusieurs contre-électrodes permet de provoquer la copolymérisation des pyrroles de façon à fixer les molécules sondes sur les sites.

La plage de test peut comporter, par exemple, un premier plan conducteur électrique formant électrode, ce plan étant recouvert d'une couche de matériau isolant électrique qui entoure et définit l'emplacement des sites d'analyse. Un deuxième plan conducteur formé au-dessus de la couche de matériau isolant électrique peut alors constituer la contre-électrode. Le matériau isolant est, par exemple du polyimide.

Selon une variante, la contre-électrode peut aussi être séparée du support d'analyse.

La description qui suit se rapporte à un procédé de fabrication d'un support d'analyse dont les

principales étapes sont illustrées par les figures 3A à 3D.

Le substrat 10 visible sur la figure 3A est désigné par substrat principal. Il s'agit d'un substrat de type SOI (silicium sur isolant) comprenant en surface une couche mince de silicium 2, séparée d'une couche épaisse 4, également en silicium, par une couche d'isolant 6. La couche d'isolant intermédiaire, en oxyde de silicium, est encore appelée "couche enterrée". Elle est utilisée en particulier comme couche d'arrêt de gravure dans les opérations de gravure qui suivent. La couche épaisse 4 est encore désignée par "couche arrière".

Dans une première étape, on forme les électrodes 22 des sites d'analyse, les éléments de contrôle de la température 31 et les bornes électriques de contact 40, sur une face principale du substrat correspondant à la couche mince de silicium 2. Les éléments de contrôle de la température sont formés dans une région dite de multiplication.

Les électrodes 22 des sites d'analyse, en or, par exemple, peuvent être remplacées, selon les applications, par de simples plots d'accrochage de sondes sans propriétés conductrices.

Lors de la première étape du procédé, on forme également les pistes conductrices qui relient les électrodes 22 et les éléments 31 de contrôle de la température aux bornes électriques de contact 40. Ces pistes ne sont pas représentées pour des raisons de clarté.

Une deuxième étape, illustrée par la figure 3B, comprend la gravure d'orifices dans la couche mince superficielle 2 du substrat. Il s'agit en particulier

des orifices d'entrée 34 et de sortie 36 des canaux non encore réalisés. La gravure est par exemple une gravure par plasma avec arrêt sur la couche d'oxyde enterrée 6.

La deuxième étape comprend également un
5 amincissement du substrat consistant à diminuer l'épaisseur de la couche arrière 4. L'épaisseur totale du substrat 10 est portée à environ 250µm.

Après l'amincissement, la face arrière du substrat, c'est-à-dire la face opposée aux électrodes
10 est soumise à une gravure chimique humide locale pour pratiquer dans la couche arrière des canaux 30 qui s'étendent respectivement depuis un orifice d'entre 34, jusqu'à un orifice de sortie 36.

Une deuxième gravure est prévue pour éliminer
15 la couche d'oxyde enterrée restant au fond des canaux et pour faire communiquer les canaux 30 avec les orifices 34, 36. Le substrat principal tel qu'obtenu au terme de cette gravure est illustré par la figure 3C.

On peut observer que la hauteur des canaux est
20 ajustable lors de l'amincissement de la couche arrière 4. Le procédé est adapté en particulier pour la réalisation de canaux profonds, de l'ordre de 20 à 500µm.

Par ailleurs, on note que les éléments de
25 contrôle de la température 31 sont séparés des canaux par une paroi mince, constituée par la couche mince superficielle 2 du substrat 10.

La figure 3D montre le report du substrat principal 10 sur un substrat de support 1 en silicium.
30 Le report est effectué en collant la couche arrière 4 du substrat principal sur le substrat de support, de sorte que ce dernier constitue une paroi de fond commune pour les canaux 30.

La figure 3D montre également le report par collage, de la face avant du substrat principal 10 sur une plaque formant le capot 12.

Le capot 12 est découpé de façon à y ménager
5 les réservoirs d'entrée 14 et de sortie 16. Une partie centrale 12a du capot s'appuie sur la face supérieure du substrat pour y recouvrir les éléments de contrôle de la température 31. Cette partie sépare également le réservoir d'entrée 14 du réservoir de sortie 16. Le
10 réservoir d'entrée 14 coïncide avec les orifices d'entrée 34 et le réservoir de sortie coïncide avec la plage de test 18 qui comprend les orifices de sortie 36 et les sites d'analyse.

Selon une variante, le capot peut être formé
15 par le dépôt sur le substrat principal d'une couche épaisse de polyimide, puis par la gravure de cette dernière pour y pratiquer les réservoirs d'entrée et de sortie. Le dépôt de cette couche et sa gravure ont alors lieu de préférence avant la gravure des orifices
20 d'entrée et de sortie des canaux.

Dans l'exemple de la figure 3D, le substrat de support 1 a essentiellement une fonction de maintien de la rigidité du support d'analyse. Selon une variante
25 cependant, représentée à la figure 4, le substrat de support 1, également du type SOI, peut comporter des éléments de contrôle de la température 31a conjugués à ceux présents sur le substrat principal.

Dans l'exemple illustré, le substrat de support
30 présente des résistances électriques sur sa face tournée vers le substrat principal, dans une région coïncidant avec les canaux 30, c'est-à-dire avec la région de multiplication. Les résistances électriques

qui forment les éléments de contrôle de la température 31a sont électriquement connectés à des bornes 41, formées sur un bord du substrat de support. Les pistes de connexion entre les résistances et les bornes ne
5 sont pas représentées pour des raisons de clarté.

On observe toutefois qu'une liaison par fil 50 relie respectivement des bornes 41 du substrat de support à des bornes correspondantes 40 du substrat principal pour conjuguer les éléments de contrôle de la
10 température, situés dans une même zone des canaux 30.

On décrit à présent en référence aux figures 5A à 5F un autre procédé de fabrication possible pour le support d'analyse, mieux adapté à la réalisation de
15 canaux peu profonds, c'est-à-dire avec une profondeur comprise entre 5 et 50µm.

La figure 5A montre une première étape du procédé qui consiste à graver dans un premier substrat 1, ou substrat de support, une ou plusieurs rainures.
20 Les rainures, indiquées avec la référence 30 correspondent aux canaux du support d'analyse.

Les canaux sont achevés comme le montre la figure 5B en scellant sur le substrat de support 1 un substrat principal 10 qui recouvre les rainures.
25 Lorsque les substrats de support et principal sont tous deux en silicium, le scellement peut être un scellement direct (Silicon Direct Bonding) sans apport de matière.

Une opération de gravure ou de polissage, en particulier un polissage mécano-chimique permet de
30 réduire l'épaisseur du substrat principal 10 jusqu'à une valeur de l'ordre de 1 à 100 µm.

Cette étape, illustrée à la figure 5C permet de réduire l'inertie thermique du substrat principal,

notamment dans la zone dite de multiplication, où se trouvent les canaux 30.

La figure 5D montre la réalisation des bornes d'adressage 40, des éléments de contrôle de la température 31 et des électrodes 22 des sites d'analyse. Les éléments de contrôle de la température 31 sont des résistances formées sur le substrat principal aminci, au-dessus des canaux 30. Des liaisons électriques entre les bornes 40 et les éléments de contrôle de la température 31 ou les électrode 22 ne sont pas représentées, mais sont également réalisées lors de l'étape du procédé correspondant à la figure 5D.

On peut se reporter à ce sujet à la description précédente.

Eventuellement, un adressage électrique des sites d'analyse peut être omis. Dans ce cas, les électrodes 18 peuvent être remplacées par des plots d'oxyde de silicium SiO_2 qui autorisent un bon couplage avec la poly-lysine ou les silanes.

Les sondes distribuées par système de grande précision sont alors fixées sur les plots préalablement silanisés ou recouverts par un polymère de type lysine.

La figure 5E montre la formation d'orifices 34, 36 d'entrée et de sortie des canaux. Les orifices sont ménagés de part et d'autre de la zone de multiplication, et coïncident sensiblement avec les extrémités des canaux.

Une dernière figure 5F montre la réalisation d'un capot 12.

Comme indiqué précédemment, celui-ci peut être formé par le dépôt d'une couche épaisse de polyimide puis par la gravure de cette couche pour former les

réservoirs d'entrée et de sortie 14, 16 et pour libérer la plage de test 18.

DOCUMENTS CITES

5

(1)

"A DNA Microarray System for Analyzing Complex DNA Samples Using Two-color Fluorescent Probe Hybridization"

10 Analytical Methods & Instrumentation, Special Issue
µTAS'96

Dari Shalon et al.

15 (2)

"Covalent Attachment of Hybridizable Oligonucleotides to Glass Supports"

Analytical Biochemistry 247, 96-101 (1997), Article
n° AB972017

20 Beda Joos et al.

(3)

"Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips"

25 Biosensors & Bioelectronics 13 (1998) 629-634

Thierry Livache et al.,

(4)

"High-Density PCF and Beyond"

30 µTAS'96 Analytical Methods & Instrumentation

Thimothy M. Woudenberg et al.,

(5)

"Continuous flow PCR on a chip"

pages 7-10

Martin U. Kopp et al.,

5 Imperial College of Science, London.

(6)

"Integrated Miniature DNA-Based Analytical
Instrumentation

10 pTAS'96, pages 153-157

19-22 Novembre 96 Basel

M. Allen Northrup, et al.

REVENDICATIONS

1. Support d'analyse biologique comprenant au moins une plage de test (18) équipée d'une pluralité de sites d'analyse (20) susceptibles d'être garnis de sondes biologiques, au moins un réservoir (14) destiné à contenir un milieu à analyser et au moins un passage (30) de fluide dudit réservoir vers ladite plage de test, dans lequel le passage de fluide comporte des moyens (31) de contrôle de température, agencés le long du passage de fluide.

2. Support d'analyse selon la revendication 1, dans lequel le passage de fluide comprend une pluralité de canaux (30) juxtaposés, s'étendant entre le réservoir (14) et la plage de test (18).

3. Support d'analyse selon la revendication 1, dans lequel les moyens (31) de contrôle de température comprennent une pluralité d'éléments de chauffage définissant des zones de chauffage qui se succèdent entre le réservoir (14) et la plage de test (18).

4. Support d'analyse selon la revendication 3, dans lequel les éléments de chauffage sont des résistances électriques.

5. Support d'analyse selon la revendication 3, dans lequel les éléments de chauffage sont disposés dans le passage de fluide.

6. Support d'analyse selon la revendication 3, dans lequel les éléments de chauffage sont séparés du passage du fluide par une paroi.

7. Support d'analyse selon la revendication 1, comprenant une pluralité d'électrodes (22) formant lesdits sites d'analyse.

5

8. Support d'analyse selon la revendication 7 comprenant une pluralité de contre-électrode (23) ménagées respectivement au voisinage desdites électrodes (22).

10

9. Support d'analyse selon la revendication 7, comprenant un réseau d'adressage électrique multiplexé des électrodes.

15

10. Support d'analyse équipé d'au moins un premier plan conducteur, formant électrode, sur lequel est défini au moins un site d'analyse, et au moins un deuxième plan conducteur formant contre-électrode, une tension de polarisation étant susceptible d'être appliquée entre les premier et deuxième plans conducteurs pour provoquer une fixation de sondes moléculaires déposées sur ledit site d'analyse.

20

11. Support d'analyse selon la revendication 10, dans lequel les premier et deuxième plans conducteurs sont séparés par une couche de matériau isolant électrique.

25

12. support d'analyse selon la revendication 10, dans lequel le deuxième plan est séparé d'une structure comprenant le premier plan conducteur.

30

13. Support d'analyse selon la revendication 4, comprenant un réseau d'adressage électrique (42) multiplexé des résistances électriques de chauffage.

5 14. Support d'analyse selon la revendication 1, comprenant des moyens électriques (35) de chauffage des sites d'analyse.

10 15. Support d'analyse selon la revendication 1, comprenant des moyens électriques (33) de chauffage associés au réservoir.

15 16. Procédé de fabrication d'un support d'analyse selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :

- 20 - la formation de résistances de chauffage sur une première face d'un substrat principal dans une région dite de multiplication, et la formation de sites d'analyse sur la première face, en dehors de la région de multiplication,
- 25 - la formation d'au moins un orifice d'entrée sur un côté de la région de multiplication éloigné des sites d'analyse, et la formation d'au moins un orifice de sortie sur un côté de la région de multiplication tourné vers les sites d'analyse, les orifices s'étendant partiellement dans le substrat principal depuis la première face,
- 30 - la formation d'au moins une rainure dans le substrat principal depuis une deuxième face, opposée à la première face, la rainure s'étendant dans la région de multiplication et reliant au moins un orifice d'entrée à au moins un orifice de sortie,

- après la formation de la rainure, le report du substrat principal sur un substrat de support par la deuxième face, de façon à recouvrir chaque rainure,
- la mise en place d'un capot ajouré s'appuyant sur la première face du substrat principal, le capot délimitant au moins un réservoir qui entoure au moins un orifice d'entrée, et délimitant une plage de test qui comprend les sites d'analyse et au moins un orifice de sortie.

10

17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel une portion du capot recouvre les résistances de chauffage.

15

18. Procédé selon la revendication 16, dans lequel on forme en outre des résistances de chauffage (31a) sur une face du substrat de support tournée vers le substrat principal lors du report, dans une région coïncidant avec la région de multiplication du substrat principal.

20

19. Procédé de fabrication d'un substrat d'analyse selon la revendication 1, dans lequel :

- on grave dans un substrat de support, au moins une rainure,
- on reporte sur le substrat de support, un substrat principal de façon à fermer la rainure,
- on forme sur le substrat principal des résistances électriques dans une région dite de multiplication coïncidant avec ladite rainure,
- on forme des sites d'analyse dans une région hors de la région de multiplication, au voisinage d'une extrémité de la rainure,

25

30

- on pratique au moins un orifice d'entrée dans le substrat principal, traversant ledit substrat principal et communiquant avec une extrémité d'au moins une rainure, tournée à l'opposé des sites d'analyse,
- on pratique au moins un orifice de sortie dans le substrat principal et communiquant avec l'extrémité d'au moins une rainure, tournée vers les sites d'analyse,
- on met en place un capot ajouré s'appuyant sur le substrat principal, le capot délimitant au moins un réservoir qui entoure au moins un orifice d'entrée, et délimitant au moins une plage de test qui comprend des sites d'analyse et au moins un orifice de sortie.

20. Procédé selon la revendication 19, comprenant en outre, après le report du substrat principal, un amincissement de celui-ci.

21. Procédé de fabrication d'un support d'analyse selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :

- la formation de résistances électriques sur une face d'un substrat dans une région dite de multiplication,
- la formation de sites d'analyse en dehors de la région de multiplication,
- la mise en place d'au moins un capot ajouré sur le substrat, le capot délimitant au moins un réservoir en dehors de la région de multiplication, et délimitant une plage de test comprenant les sites d'analyse, le capot étant traversé dans la région de

multiplication d'au moins un passage reliant le réservoir à la plage de test.

22. Procédé selon la revendication 21, dans
5 lequel, pour former le passage, on pratique une pluralité de rainures dans une partie du capot destinée à recouvrir le substrat depuis le réservoir jusqu'à la plage de test et on reporte le capot sur le substrat de façon à recouvrir les rainures.

10

23. Procédé selon la revendication 21, dans lequel on pratique les rainures dans une couche (28) de polyimide du capot.

1/4

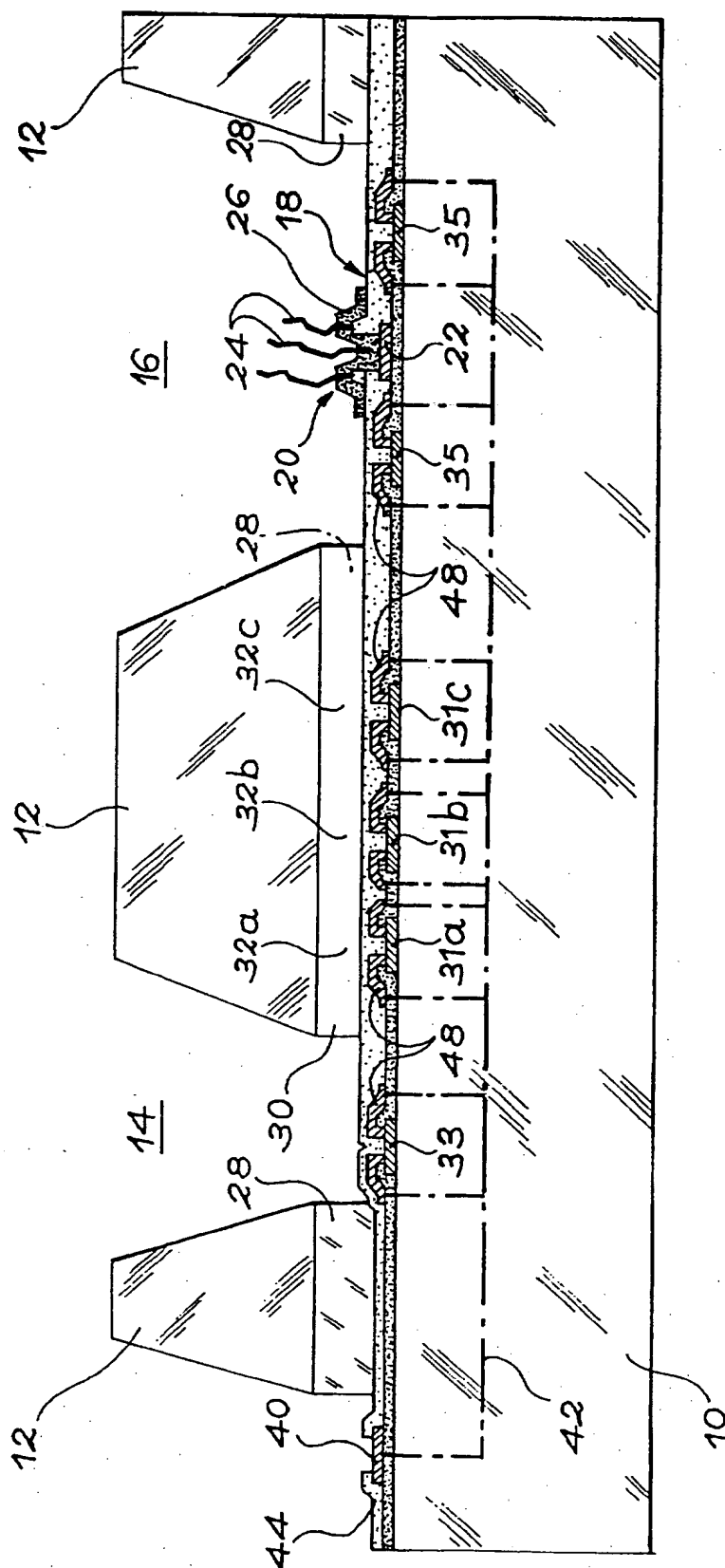
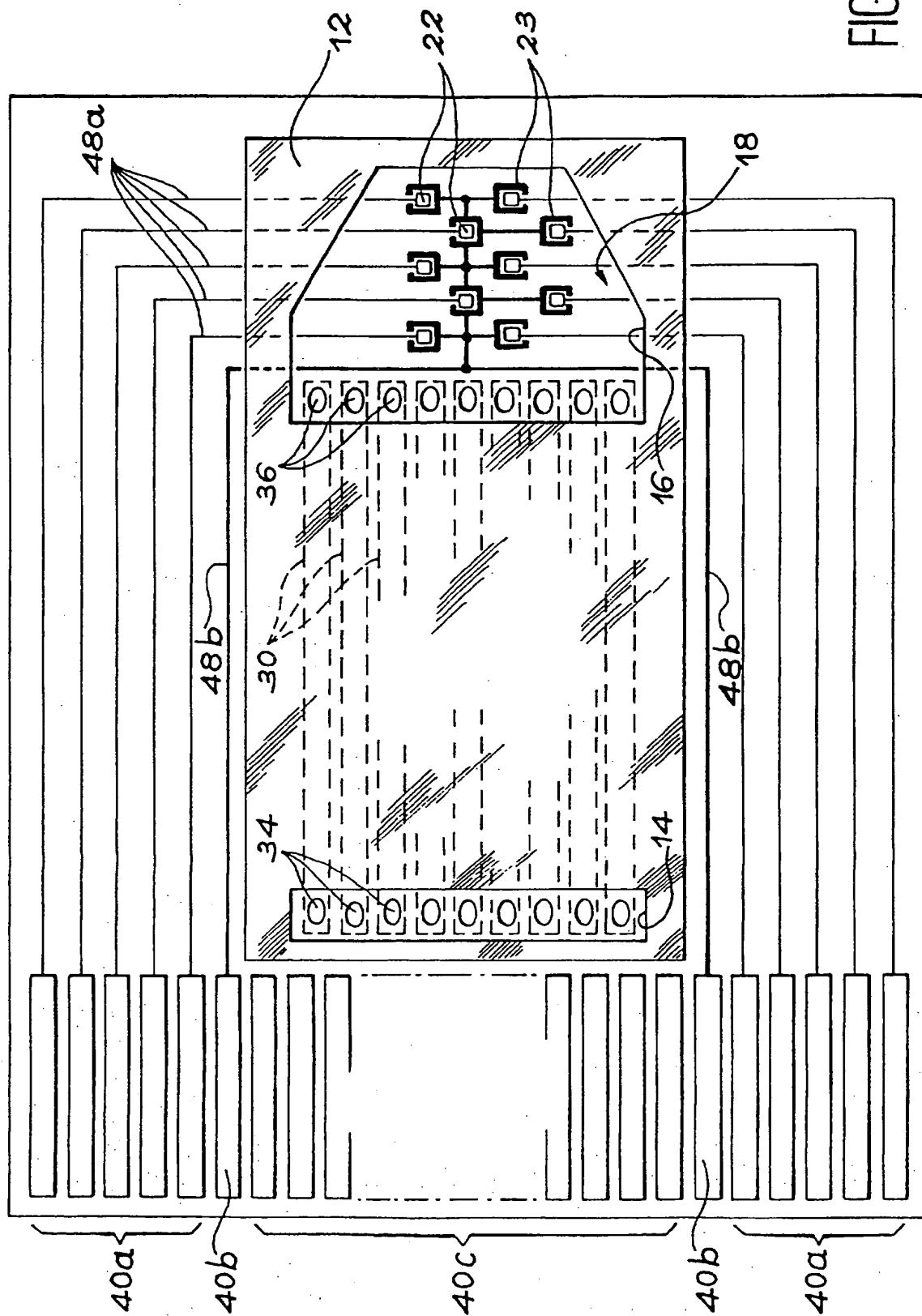


FIG. 1

2/4

FIG. 2



3/4

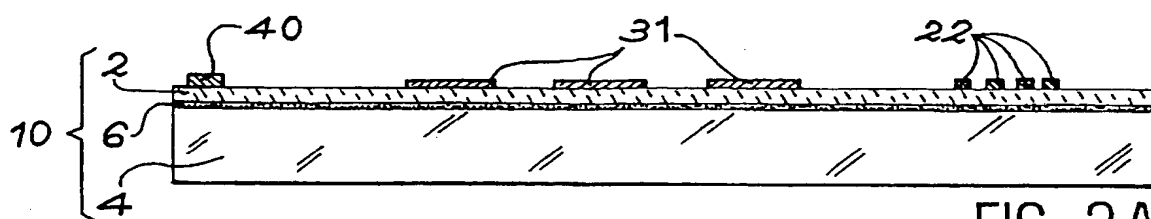


FIG. 3A

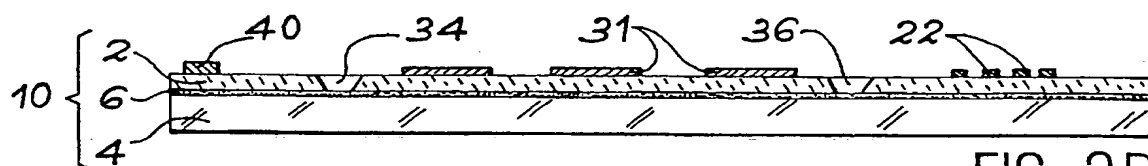


FIG. 3B

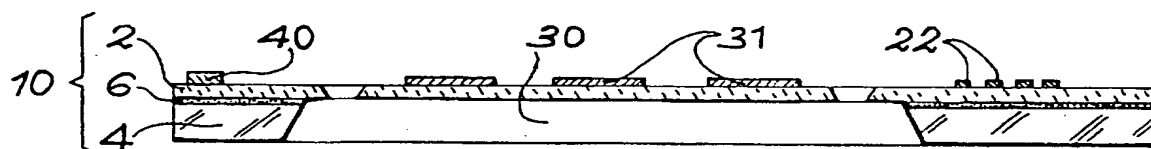


FIG. 3C

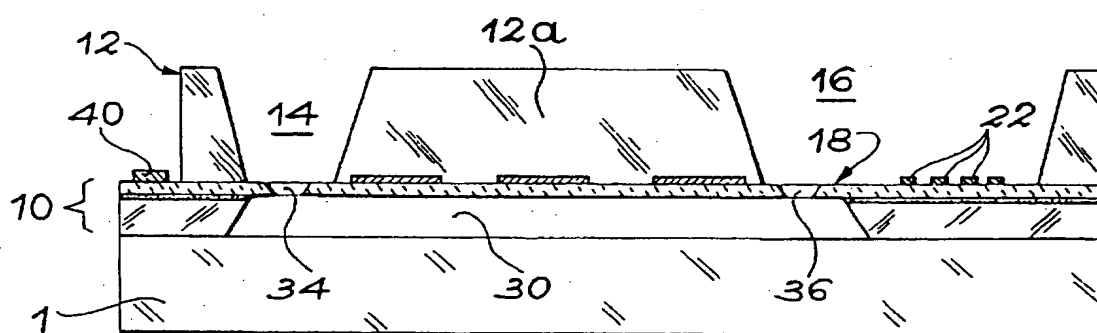


FIG. 3D

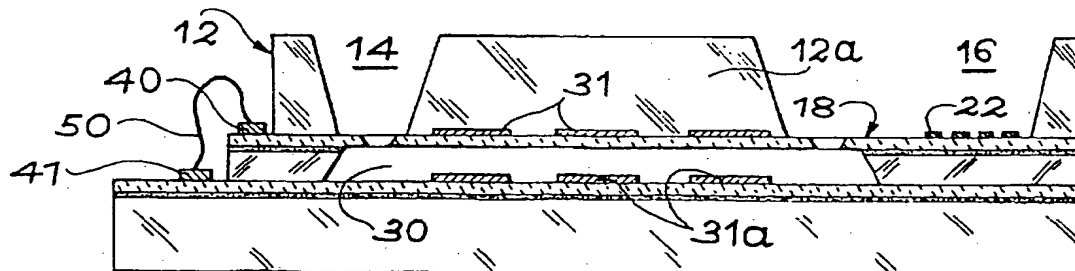


FIG. 4

4/4

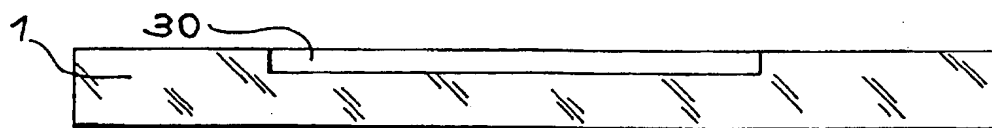


FIG. 5A

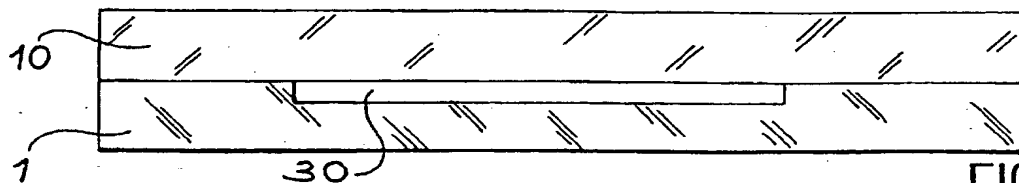


FIG. 5B

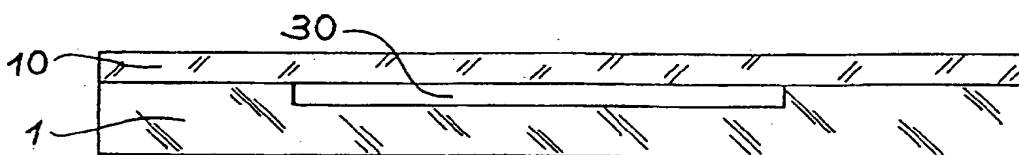


FIG. 5C

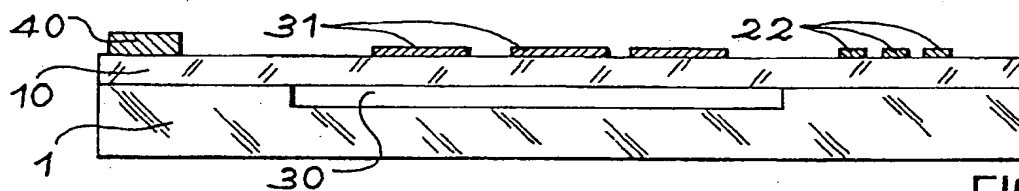


FIG. 5D

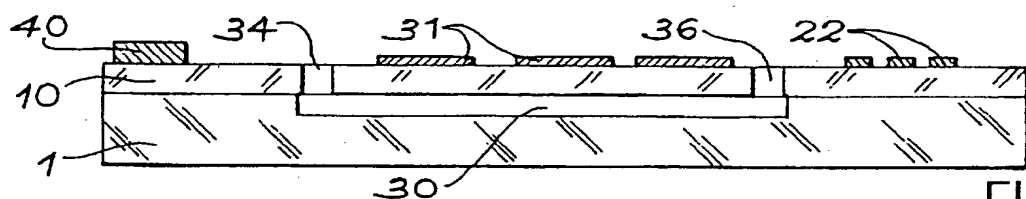


FIG. 5E

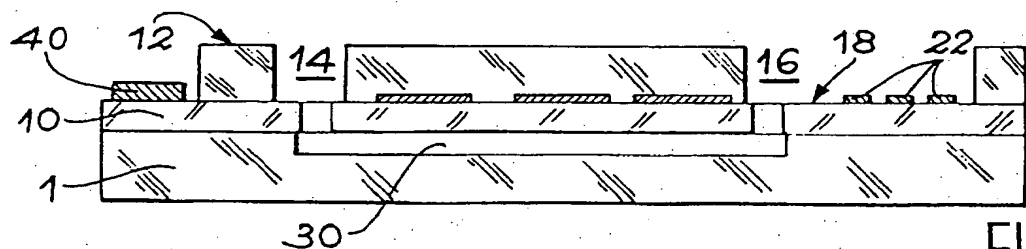


FIG. 5F

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 582819
FR 9907948

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | | Revendications concernées de la demande examinée |
|---|--|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | | |
| X | US 5 856 174 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 5 janvier 1999 (1999-01-05) * colonne 4, ligne 48 - ligne 55 * | 1 | |
| Y | * colonne 6, ligne 29 - ligne 40 * | | |
| Y | * colonne 9, ligne 30 - ligne 52 * | 7-9, 14 | |
| Y | * colonne 11, ligne 43 - ligne 57 * | | |
| A | * colonne 14, ligne 25 - colonne 16, ligne 34; figures 2, 3 * | 16-23 | |
| X | * colonne 19, ligne 7 - ligne 12; figures * | 3 | |
| X | * colonne 19, ligne 1 - ligne 3 * | 4-6 | |
| X | * colonne 31, ligne 1 - ligne 7 * | 2 | |
| Y | EP 0 882 981 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 9 décembre 1998 (1998-12-09) * colonne 1, ligne 23 - colonne 2, ligne 22 * | 7-9 | |
| Y | * colonne 5, ligne 14 - ligne 21 * | 14 | |
| A | LIVACHE T ET AL: "ELECTROCONDUCTING POLYMERS FOR THE CONSTRUCTION OF DNA OR PEPTIDE ARRAYS ON SILICON CHIPS" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, vol. 13, 1998, pages 629-634, XP000869823 ISSN: 0956-5663 * page 633, colonne 2, alinéa 3 * | 1-9, 13-23 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7) |
| | | | BOIL GOIN |
| A | US 5 866 345 A (WILDING PETER ET AL) 2 février 1999 (1999-02-02) | 1 | |
| A | * colonne 3, ligne 8 - ligne 30; figures * | 16-23 | |
| A | * colonne 14, ligne 20 - colonne 15, ligne 15; figures 15, 16 * | | |
| A | US 5 589 136 A (CARRANO ANTHONY V ET AL) 31 décembre 1996 (1996-12-31) * colonne 7, ligne 59 - colonne 8, ligne 58; figures 6-8 * | 16-23 | |
| | -/- | | |
| Date d'achèvement de la recherche | | | Examineur |
| 4 mai 2000 | | | Hocquet, A |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES | | | |
| X : particulièrement pertinent à lui seul | | T : théorie ou principe à la base de l'invention | |
| Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie | | E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. | |
| A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général | | D : cité dans la demande | |
| O : divulgation non-écrite | | L : cité pour d'autres raisons | |
| P : document intercalaire | | & : membre de la même famille, document correspondant | |

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 582819
FR 9907948

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|---|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| A | WO 98 32535 A (VIOVY JEAN LOUIS ; LINDBERG PETER (SE); ROERADE JOHAN (SE); STJERN) 30 juillet 1998 (1998-07-30) * page 3, ligne 7 - ligne 27 * | 20 |
| A | WO 98 08978 A (HUI MAY ; DUNN JAMES M (CA); LEUSHNER JAMES (CA); WATERHOUSE PAUL () 5 mars 1998 (1998-03-05) * page 11, ligne 12 - page 12, ligne 5; figure 4 * * page 9, ligne 5 - page 10, ligne 6 * | 1 |
| A | WO 99 27140 A (VO DINH TUAN ; WINTENBERG ALAN (US); ERICSON MILTON N (US); LOCKHEE) 3 juin 1999 (1999-06-03) * page 5, ligne 6 - ligne 27; figure 1 * * page 66, ligne 5 - ligne 22; figures 24-26 * * page 15, ligne 16 - ligne 19 * | 1 |
| A | DE 197 17 085 A (BRUKER FRANZEN ANALYTIK GMBH) 5 novembre 1998 (1998-11-05) * colonne 4, ligne 15 - ligne 24; figures * | 1-5 |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7) |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur |
| 4 mai 2000 | | Hocquet, A |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

1

EPO FORM 1 (503 03.02 (P01C19))

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.